

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Prof. Dr. R. Duesberg

Die Permeation anorganischer Ionen durch die Erythrozytenzellmembran

Eine Untersuchung über Struktur und Eigenschaften der Zellmembran

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
Medizinischen Doktorwürde
an der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
ROLAND WANITSCHKE
aus Katscher/Sudetenland

Mainz 1963

1964

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Prof. Dr. R. Duesberg

Die Permeation anorganischer Ionen durch die Erythrozytenzellmembran

Eine Untersuchung über Struktur und Eigenschaften der Zellmembran

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
Medizinischen Doktorwürde
an der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
ROLAND WANITSCHKE
aus Katscher/Sudetenland

Mainz 1963

Dekan:

Prof. Dr.Dr. K. Wagner

Referent:

Prof. Dr. R. Duesberg

Tag der mündl. Prüfung: 14. Mai 1964



Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet.

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

	Seite
I. Einleitung	1
Aufgabenstellung der Arbeit	4
Übersicht der ausgeführten Versuche und Verzeichnis aller verwendeten Isotope sowie ihrer Verbindungen	6
II. Methodik	7
III. Ergebnisse	
A. Einbau und Eluierung der auf Seite 6 genannten Ionen und Verbindungen in Abhängigkeit der Zeit. Bestimmung der Verteilung auf Stroma und Hämoglobin nach erfolgter Markierung:	
1. Ionen mit Kugelform und unterschiedlicher Größe und Ladung	11
2. Ionen mit Tetraederform und unterschiedlicher Größe und Ladung	16
3. Ionen mit Octaederform und unterschiedlicher Größe und Ladung	22
4. Ionen, die in linearer Kettenform vorliegen	25
5. Ionen, die als planare Scheiben aufgefaßt werden können und Unterschiede in Größe und Ladung aufweisen	27
B. Versuche zur Abschätzung der Stärke der Zellmembran bei Rindererythrozyten	30
IV. Diskussion der Ergebnisse	
A. Zur Permeation anorganischer Ionen durch die Erythrozytenzellmembran	32
a) Permeation und Ionengröße	34
b) Permeation und Ionenform	34
c) Permeation und Ionenladung	35
d) Einbaugeschwindigkeit und Elution anorganischer Ionen	36
Tabellarische Übersicht der Ergebnisse	37
B. Zu dem Modellversuch über die vorliegende Stärke der Zellmembran bei Rindererythrozyten	39
V. Zusammenfassung	41
Literaturverzeichnis	42

Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Einleitung

Die Struktur der Membran roter Blutkörperchen ist trotz zahlreicher und methodisch sehr unterschiedlicher Untersuchungen bis heute weitgehend unbekannt. Alle Bemühungen, eine Deutung der Molekularstruktur zu sichern, blieben lediglich ein Versuch, bestimmte Vorstellungen auszuschließen und durch Anschauungen zu ersetzen, die möglichst vielen Einzelbeobachtungen gerecht werden. Die Vielzahl der vertretenen Anschauungen ist bezeichnend für die mannigfachen Unsicherheitsfaktoren und beweist, neben dem großen Interesse an der Klärung dieser Fragen, die Schwierigkeiten der Materie selbst sowie die Unzulänglichkeit der bisherigen Methoden. Eine umfassende Deutung, die allen Einzelbeobachtungen genügt, ist heute noch nicht möglich. Die negative Ladung der Erythrozytenoberfläche in physiologischem Milieu ist seit langem bekannt^{1a)}. Für die Deutung der bikonkaven Form und deren Stabilisierung fehlen bisher eindeutige Untersuchungen. Die darüber vorliegenden Befunde^{3,21)} deuten darauf hin, daß Stomatinteile, also Eiweißbausteine der Gerüstsubstanz, für diese Formerhaltung entscheidend sind. Nach neueren Befunden^{25a,39a)} besteht ein enger Zusammenhang zwischen Form und Energiebilanz der roten Blutzelle. Wagner und Mitarbeiter^{39a)} fanden nach Erwärmen der Erythrozyten auf 50°C für die Dauer einer Stunde die Aktivität der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase um den Faktor sechs herabgesetzt. Auch biochemische Untersuchungen gealterter menschlicher Erythrozyten^{25a)} zeigen einen Abfall der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase, so daß die Wärmealteration als eine zeitliche Raufung physiologischer Alterungsprozesse aufgefaßt werden kann. Der Aktivitätsabfall der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase bewirkt über den Weg der Einschränkung der glykolytischen Prozesse der roten Blutzelle einen Energieverlust derselben, so daß der Erythrozyt den energetisch stabilsten Zustand, nämlich die Kugelform, annimmt, da die Energie für die Erhaltung der bikonkaven Form fehlt. Die Befunde bekräftigen die Ansicht von Ruhenstroth-Bauer^{37a)}, daß die Kenntnis aller Mem-

branbausteine, die die Form bestimmen, noch nichts aussagt über diejenigen Kräfte, die diese Form tatsächlich erzeugen.

Die Angaben über die Stärke der Membran schwanken nicht nur von Methode zu Methode, sondern ebenso von Autor zu Autor. Aus Messungen über die elektrische Leitfähigkeit wird die Dicke auf etwa 50 Å geschätzt¹¹⁾. Leptoskopische Untersuchungen weisen auf Membranstärken von etwa 200 Å⁴⁰⁾. Polarisationsoptisch erhaltene Werte schwanken sehr erheblich und werden wegen des verbleibenden Resthämoglobins im Stroma von den Autoren selbst als zu hoch betrachtet. Mit- chison²⁸⁾ fand Werte zwischen 1000 und 5000 Å. Noch stärker unterscheiden sich, je nach der Art der Stromaaufbereitung, die Resultate, die durch die Elektronenmikroskopie gewonnen wurden: 50 Å¹⁹⁾, 150-300 Å⁴⁶⁾, 300-800 Å²⁾, 500 bis 1000 Å³⁾. Latta²³⁾ konnte zeigen, daß auch innerhalb der Einzelzelle die Membranstärke unterschiedliche Werte annimmt. Daß diese in Abhängigkeit vom pH starken Schwankungen unterliegt, ist bei Kenntnis der sie aufbauenden Bestandteile verständlich⁴⁰⁾.

Es sind in erster Linie Proteine, die fast 90 % des Stromamaterials liefern³²⁾. Die wesentliche Komponente unter diesen scheint das Elinin^{28a)} zu sein. Unter den Proteinen ist auch das Hämoglobin zu nennen, da stets etwa 2 % des Gesamthämoglobins der Zelle im Stroma gefunden wurden. Es ist möglicherweise als Strukturbaustein aufzufassen^{32,35)}. Ob dieses Hämoglobin tatsächlich strukturbildend ist oder nur mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht auswaschbar, bedarf weiterer Klärung. In dieser Fraktion sind auch die Enzyme sowie die Blutgruppensubstanzen zu erwähnen^{19b)}.

Zur Lipidfraktion sind etwa 10 % aller Stromabausteine zu rechnen³²⁾. Ihre Zusammensetzung ist vielfach untersucht und bestätigt worden^{9,10,43)}: 40 % Phosphatlipide (Cephalin 37 %, Lecithin 35 %, Sphingomyeline 28 %), 35 % Cholesterin. Die verbleibenden 25 % entfallen auf Cerebroside, Ganglioside und Neutralfette. Vom Gesamtvolumen des Erythrozyten entfallen etwa 10 % auf die Membran³⁵⁾.

In welcher räumlichen Ordnung diese Bestandteile das Stroma bilden, ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Es scheint sehr wahrscheinlich zu sein, daß die Erythrozytenmembran nicht, wie früher angenommen, schwammartigen Charakter hat, sondern daß sie vielmehr aus einzelnen mehrschichtigen Hüllen besteht^{21,36,37a,44,45}). Wolpers⁴⁵) nimmt an, daß die Einzelschichten sich aus Lipiden und Proteinen zusammensetzen und miteinander verbunden sind. Ponder²¹) und Bungenberg de Jong⁴⁴) halten eine strenge Schichtung der Einzelbausteine für wahrscheinlich.

Während Ponder in seinem Membranmodell zwei Komponenten in der Hülle annimmt, nämlich tangential zur Oberfläche laufende Stromatinbündel neben radial geordneten Lipiden, die mit ihren Fettsäureketten zur Oberfläche ragen^{aus 21;38}), vertritt Bungenberg de Jong in seinem Modell die Ansicht, die Oberflächenhülle des Erythrozyten sei eine reine Lipidschicht. Ruhenstroth-Bauer^{37a}) schätzt ihre Stärke auf etwa 31 Å. Die zelleinwärts folgende Hülle habe vorwiegend Proteincharakter und eine Stärke von 37 Å^{37a}). Über die Einlagerung von strukturbildendem Hämoglobin kann nichts Sicheres gesagt werden. Bungenberg de Jong hält es für wahrscheinlich, daß es eine Grenzschicht gegen das Zellinnere darstellt. Eine Reihe weiterer, z.T. sehr unterschiedlicher Untersuchungen deutet ebenfalls darauf hin, daß der Erythrozyt außen von einer Lipidschicht umgeben ist^{21,29,37a,44}).

Elektronenoptische Untersuchungen haben bei der Klärung dieser Fragen nur zum Teil die zunächst gehegten Erwartungen erfüllt. Hillier und Hoffman¹⁹) vermuten auf der Oberfläche des Erythrozyten "plakettenähnliche Strukturen" von einer Dicke von etwa 50 Å, die sich aus Proteinen zusammensetzen und durch Fette miteinander in Verbindung stehen sollen. Die dazwischen liegenden Spalten könnten "Poren" darstellen. Dieser Befund würde mit dem Membranmodell von Ponder in Einklang stehen.

Inwieweit nur die Stromaoberfläche Strukturen aufweist oder die gesamte Membranhülle, ist nicht erwiesen. Röntgenstrukturuntersuchungen¹⁸) lassen vermuten, daß lediglich die

Oberfläche aus diskreten Schichten mit einer bestimmten, molekularen Struktur besteht.

Die bisher in der Literatur beschriebenen Untersuchungen und Teilergebnisse lassen eine eindeutige Aussage über die Feinstruktur der Erythrozytenmembran noch nicht zu.

Wenn man nun versucht, Vorstellungen über den Stofftransport durch ein solches Medium, dessen Struktur weitgehend unbekannt ist, aufzustellen, sieht man sehr bald die gebotenen Grenzen. Viele Mechanismen sind zur Klärung entwickelt und mit Experimenten belegt worden, aber es fehlt die umfassende Übereinstimmung der einzelnen Befunde. So ist auch heute noch der Transportmechanismus durch die Zellmembran unbewiesen. Ob es sich um reine Diffusion oder um aktiven Transport über eine Wechselwirkung chemischer Gruppen des diffundierenden Teilchens mit Stromaanteilen handelt (sog. "Carrier-Funktion"¹⁶⁾), ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Wolpers⁴⁵⁾ und Ponder^{aus 36)} glauben, daß die Lipide der Membran als die wesentlichen Träger der Permeabilitätsvorgänge anzusehen sind.

In einer Reihe von Arbeiten wird von "Poren" berichtet, die in das Zellinnere führen.

Wolpers⁴⁵⁾ konnte zeigen, daß mit Fettlösungsmitteln behandelte Erythrozytenmembranen elektronenoptisch "Substanzdefekte" von etwa 50 μ Durchmesser aufwiesen, die in das Zellinnere führten. Jung²¹⁾ fand nach Gallensäure- bzw. Bleibehandlung der Erythrozytenmembran konzentrische Bereiche mit einem Durchmesser von etwa 10 bis 20 μ . Er hält diese für "Poren", also bleibende, präformierte Kanäle, die in das Zellinnere führen.

Selbst das osmotisch aufgenommene Wasser muß durch solche "Poren" gehen, da es schneller das Zellinnere erreicht, als dieses durch reine Diffusion möglich wäre²²⁾.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Permeation verschiedener anorganischer Ionen durch die Erythrozytenmembran unter Berücksichtigung folgender Gesichtspunkte untersucht:

- a) Einfluß der G r ö ß e eines Ions (effektiver Durchmesser) auf seine Permeation.

Gerade die radioaktive Markierung ist hierzu, genügend hohe spezifische Aktivität vorausgesetzt, vorzüglich geeignet, da sie die Physiologie der Zelle nicht merklich beeinträchtigt und folglich eine recht sichere Aussage über vorliegende, sterische Effekte zuläßt.

- b) Einfluß der F o r m eines Ions hinsichtlich seiner Permeation.

Untersucht wurden Ionen mit Kugelform, Tetraeder, Oktaeder, lineare Ketten und Ionen, die als planare Scheiben aufgefaßt werden können.

- c) Einfluß der L a d u n g der Ionen bezüglich ihrer Permeation.

Hier wurden Anionen und Kationen, als auch ungeladene Verbindungen geprüft.

- d) Bestimmung der E i n b a u g e s c h w i n d i g - k e i t sowie, nach erfolgter Markierung, Ermittlung der V e r t e i l u n g der Ionen auf S t r o m a und H ä m o g l o b i n .

- e) Zeitabhängige E l u t i o n e n mit physiologischer Kochsalzlösung.

Den vorliegenden Untersuchungen lag unter anderem die Absicht zugrunde, einmal zu überprüfen, inwieweit andere Radioisotope beziehungsweise deren Verbindungen zur Markierung von Erythrozyten grundsätzlich geeignet sind. Je nach ihrer Strahlungscharakteristik und ihrem chemischen Verhalten könnten sie für weitere hämatologische Untersuchungen unter Umständen von Bedeutung sein.

In dieser Arbeit wurden folgende Modellversuche mit Rindererythrozyten durchgeführt:

A. Einbau und Eluierung der folgenden Verbindungen in Abhängigkeit der Zeit; Bestimmung der Verteilung auf Stroma und Hämoglobin nach erfolgter Markierung:

- 1) Ionen mit Kugelform und verschiedener Größe und Ladung: Ba^{++} , Cs^+ , K^+ , J^- , Cl^- .
- 2) Ionen mit Tetraederform von bekannter Größe und Ladung: $\text{SeO}_3^{--} \longleftrightarrow \text{HSeO}_3^-$; $\text{SeO}_4^{--} \longleftrightarrow \text{HSeO}_4^-$; ReO_4^- ; H_2PO_4^- ; $\text{HCrO}_4^- \longleftrightarrow \text{CrO}_4^{--}$.
- 3) Ionen mit Octaederform, die sich in bekannter Größe und Ladung unterscheiden: $(\text{Co}(\text{CN})_6)^{---}$; $(\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6)^{+++}$; $(\text{Co}(\text{NH}_3)_6)^{+++}$; Cobalt-Glycinat; $(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{---}$; $\text{Co}((\text{COO})_2)_3$.
- 4) Ionen, die in linearer Kettenform vorliegen: $(\text{Ag}(\text{CN})_2)^-$; $(\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3))^{---}$.
- 5) Ionen, die als planare Scheiben aufgefaßt werden können (s. Abb. 9) und gleichfalls Unterschiede in Größe und Ladung aufweisen: $(\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4)^{++}$; $(\text{Cu}(\text{NH}_3)_4)^{++}$; $(\text{Cu}(\text{CN})_4)^{--}$; Kupfer-Glycinat; Kupfer-Acetylacetonat; Kupfer-Tartrat; $(\text{Au}(\text{CN})_4)^-$.

B. Versuche zur Abschätzung der Stärke der Zellmembran bei Rindererythrozyten.

II. Methodik

Die Untersuchungen erfolgten mit radioaktiv markierten Verbindungen. Die Isotope wurden in steriler Lösung bezogen, ihre verschiedenen Komplexe nach den in der Chemie üblichen Methoden hergestellt. Eine physiologische pH-Einstellung für die Inkubation war gewährleistet. Die Größe der Ionen sowie ihrer Komplexe wurde aus dem entsprechenden Molvolumen und der Größe ihrer Liganden errechnet:

$$\text{Volumen des Einzelteilchens} = \frac{\text{Molvolumen}}{6,023 \times 10^{23}}$$

$$\text{Radius des Einzelteilchens} \sim \sqrt[3]{\frac{\text{Molvolumen}}{24,1 \times 10^{23}}}$$

beziehungsweise aus Literaturhinweisen geschätzt^{24,25,26)}. Die spezifische Aktivität wird bei dem jeweiligen Isotop angegeben. Die Inkubation erfolgte mit ca. 1 uC/ml und Ansatz. Die Versuche wurden mit Rinderblut durchgeführt, das von frisch geschlachteten Rindern gewonnen und mit 90 ml ACD-Stabilisator auf 500 ml Gesamtblut ungerinnbar gemacht wurde (ACD-Stabilisator der Firma Braun, Melsungen: 26,6 g Natr.citr., 51/2 H₂O, 6,6 g Acid.citr., 22,0 g Glucose, Aqua bidest. ad 1 000 ml). Die Plasmaphase wurde durch Zentrifugieren (7 min. bei 3000 U/min.) entfernt und das Erythrozytensediment noch zweimal mit der doppelten Menge an physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und die Überstände verworfen (nach Zentrifugation von 7 min. bei 3000 U/min.). Das erhaltene Erythrozytensediment dürfte kaum noch Plasmaanteile enthalten. Die verbliebenen Eiweißadsorbate sollen einen spezifischen Baustein der Membran darstellen³⁴⁾.

Für die gesamten Versuchsreihen wurde pro Ansatz 1 ml dieses Erythrozytensediments in einem 90 x 10 mm Glasröhrchen mit ebenfalls 1 ml physiologischer Kochsalzlösung, die auch die zu prüfenden Ionen enthielt, inkubiert. So wurde erreicht, daß ständig während der Inkubationsphase bei einem

Hämatokrit von ungefähr 40 % gearbeitet werden konnte, so daß die Ergebnisse untereinander gut vergleichbar sind. Der Markierungsvorgang vollzog sich bei 37°C im Brutschrank. Bei längeren Inkubationsreihen, die je nach der Einbaugeschwindigkeit stark variiert werden mußten, wurden die Röhrchen in etwa halbstündigen Abständen erneut durchmischt. Nach erfolgter Markierung wurden die Überstände durch Zentrifugieren, 7 min. bei 3000 U/min., entfernt und in einen 20 ml-Meßkolben überführt. Anhaftende Reste der Inkubationslösung wurden durch zweimaliges Waschen mit einer etwa fünffachen Menge an physiologischer Kochsalzlösung entfernt und ebenfalls im Meßkolben gesammelt. Dem bis zur Eichmarke mit aqua dest. aufgefüllten Meßkolben wurde nach guter Durchmischung 1 ml entnommen und in einem gleichen Röhrchen, wie es zur Inkubation benutzt worden war, gemessen. Die Messung der Erythrozytenaktivität erfolgte in den Inkubationsröhrchen. Da Überstände und Erythrozytensediment in gleichen Röhrchen und bei gleicher Volumenmenge unter gleichen Bedingungen gemessen werden konnten, entfallen die sonst notwendigen Korrekturen (Selbstabsorption, Höhenkorrektur, Geometrie). Aus den erhaltenen Meßwerten kann die Aktivitätsverteilung direkt ermittelt werden.

Um zu differenzieren, in welchem Teil des Erythrozyten der Einbau erfolgt ist, wurde jetzt eine Hämoglobin-Stroma-Auftrennung durchgeführt. Das Erythrozytensediment mit Proben niedrigsten und höchsten Einbaus wurde durch Kälte (18 Stunden bei -18°C) hämolysiert. Danach erfolgte durch jeweiliges Auffüllen mit der etwa fünffachen Menge aqua dest. die Hämoglobin-Stroma-Auftrennung bei 4000 U/min. (20 min.). Nach sechsmaligem Waschen schien nahezu das gesamte Hämoglobin aus dem Stroma entfernt. Von den gesammelten Waschüberständen (50 ml-Kolben) wurde nach guter Durchmischung 1 ml in einem gleichen Röhrchen gemessen und direkt mit dem in 1 ml verdünnten Ammoniak aufgelösten Stroma verglichen, so daß auch hier keine Korrekturen nötig waren.

Die Elution erfolgte durch Zusatz von 2,5 ml physiologischer Kochsalzlösung zu dem markierten Erythrozytensediment in Abhängigkeit der Zeit bei 37°C. Eine Durchmischung erfolgte durch leichtes Schütteln in Zeitabständen von etwa 30 min. Die Elutionsphase wurde wiederum durch Zentrifugieren, 7 min. bei 3000 U/min., entfernt und jeweils 1 ml derselben in den bekannten Röhrchen gemessen, wobei die Korrekturen ebenfalls entfielen.

Die Zählung der γ -Strahler erfolgte in einem Szintillationsmeßgerät, das mit einem NaJ-Bohrlochkristall ausgerüstet war. Die zur Markierung eingesetzte Aktivität wurde so gewählt (von 0,2 bis 1,5 μC), daß ausreichende Zählraten zu messen waren. Bei Impulsen unter 10 000/min. wurden mehrere Werte und längere Zeiten gemessen, um den statistischen Fehler möglichst klein zu halten. Zählraten über 400 000 I/min. wurden nicht gewertet, um Koinzidenzverluste zu vermeiden. Der statistische Fehler bei Impulsraten über 10 000/min. liegt bei 1 %.

Als β -Strahler wurde ^{32}P unter ebenfalls vergleichbaren Bedingungen im Methandurchflußzähler gemessen.

Die Aufzeichnung der einzelnen Kurven erfolgte aus Gründen der Übersichtlichkeit im halblogarithmischen Maßstab, wodurch der oft recht unterschiedliche Verlauf innerhalb einer Abbildung eine bessere Darstellung ermöglichte.

Der Modellversuch zur Abschätzung der Größenordnung der Membrandicke geht auf folgende Überlegung zurück: Wenn man sich die Gesamtheit der Membran einer bekannten Erythrozytenmenge als eine Schicht vorstellen würde, müßte man, wenn man Oberfläche des Einzelerythrozyten sowie spezifisches und absolutes Gewicht des Stromas kennt, durch eine einfache Rechnung die Membranstärke ermitteln können.

So wurden 30 ml Vollblut, deren Erythrozyten in Doppelbestimmung gezählt wurden (Zählkammer nach Neubauer), bei 3000 U/min. 7 min. zentrifugiert, das Plasma verworfen, zweimal auf schon beschriebene Art und Weise verbliebene Plasmateile entfernt und das Erythrozytensediment bei -18°C hämoly-

siert. Das Auswaschen erfolgte aus zu später beschriebenen Gründen teils mit physiologischer Kochsalzlösung, teils mit aqua dest. Insgesamt wurde jeweils etwa mit dem fünffachen Volumenanteil ausgewaschen. Das so erhaltene Stroma wurde zwei Tage an der Luft getrocknet und auf einer Halbmikrowaage mit einer Genauigkeit von $\pm 10^{-4}$ g gemessen. Die Wägung erfolgte in Schälchen mit einem Leergewicht von 2,0 bis 2,5 g.

Die Oberfläche des Rindererythrozyten wurde aus seinem Diameter von $5,9 \mu^4$) auf etwa $130 \mu^2$ geschätzt. Als spezifisches Gewicht wurde das des Gesamterythrozyten, das mit $1,084^{26)}$ angegeben wird, verwendet, da andere Angaben fehlen, und diese Genauigkeit für eine approximative Abschätzung völlig ausreichend ist.

III. Ergebnisse

A.1) Ionen mit Kugelform von verschiedener Größe und Ladung

Als kleinstes Ion von Kugelform wurde das Barium verwendet. Die Inkubation erfolgte bei einer spezifischen Aktivität von 1 C/g Ba. Barium hat einen Ionendurchmesser von $2,7 \text{ \AA}^{(20,33)}$. Seine Ladung ist zweifach positiv. Der Einbau geht aus Abbildung 1 hervor.

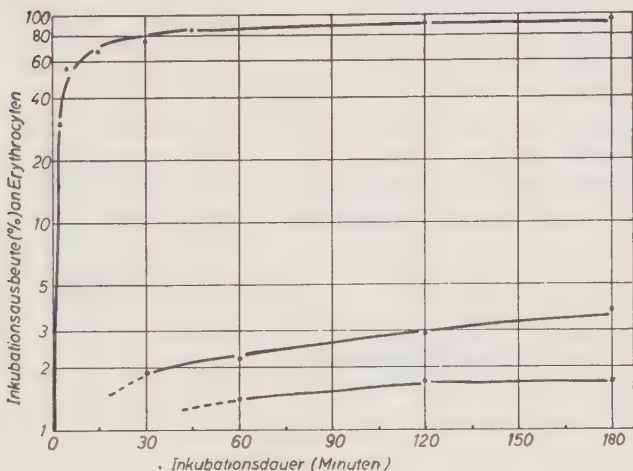


Abb. 1 Inkorporation von Ba⁺⁺ (—•—), Cs⁺ (---□---) und [Au(CN)₂]⁻ (---△---)

Die geringen Einbauraten dieses doch verhältnismäßig kleinen Ions können vorerst nur unbefriedigend erklärt werden. Einmal ist in wässriger Lösung mit einer ausgeprägten Hydratisierung des Bariums zu rechnen, die den effektiven Ionendurchmesser vergrößern muß, zum anderen sind die Elutionen derart stark (Abb. 2), daß schon durch einmaliges Waschen etwa 30 %

der inkorporierten Menge aus der Zelle diffundiert sind. Nach einer Stunde steigt die Elution schon auf über 60 %, so daß die Einbaukurve (Abb.1) wenig Aussagekraft besitzt. Analoges gilt auch für die Stromaaufbereitung. Da nach diesem Waschvorgang noch 30 % im Stroma zu messen waren, muß wohl mit einem noch größeren Anteil in dieser Fraktion gerechnet werden.

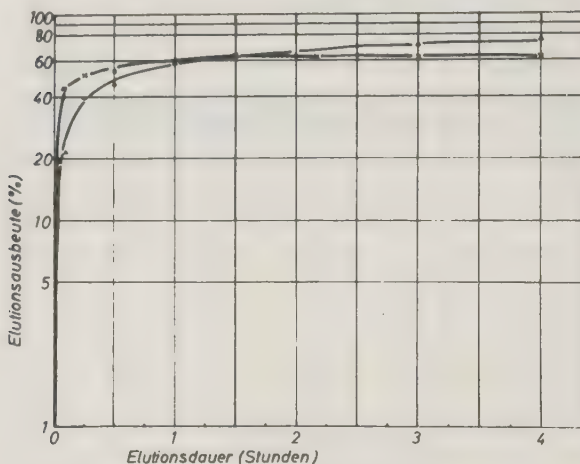


Abb 2 Elution von Ba⁺⁺(---○) und Cs⁺(—○)

Ähnliches gilt für das nächste Isotop. ¹³⁷Cs wurde bei einer spezifischen Aktivität von 25 C/g Cs eingesetzt. Sein Ionendurchmesser beträgt etwa 3,40 Å^{20,33}, die Ladung ist einfach negativ. Der Einbau scheint ein wenig höher als der des Bariums zu sein, ist aber bei 2,2 % nach einer Stunde nach wie vor niedrig. Über den Einbau von Caesium dürfte aber kein Zweifel bestehen, denn eine zeitabhängige Elution weist ganz sicher auf inkorporiertes Caesium hin (Abb.2). Der Einbau scheint jedoch wenig ausgeprägt zu sein, da keine

Bindung erfolgt und sich nur ein Ionengleichgewicht einstellt. Im Stroma zeigten sich nur Spuren von Caesium.

^{42}K , als nächstes Isotop mit einer spezifischen Aktivität von 3 mC/g untersucht, hat einen Ionendurchmesser von 2,66 Å^{20,33}). Da Kalium eine starke Hydratation zeigt, führt es in wäßriger Lösung zu einer starken Vergrößerung des effektiven Durchmessers (bis zu 6 Å). Die in der Literatur vorliegenden Untersuchungen ergeben bei in vivo-Versuchen Werte von 40 % inkorporierten Kaliums in 10,8 Stunden³⁰).

Bei den durchgeführten Markierungen fand sich nach der oben beschriebenen Methode eine auffallend niedrige Inkubationsausbeute (Abb.1a).

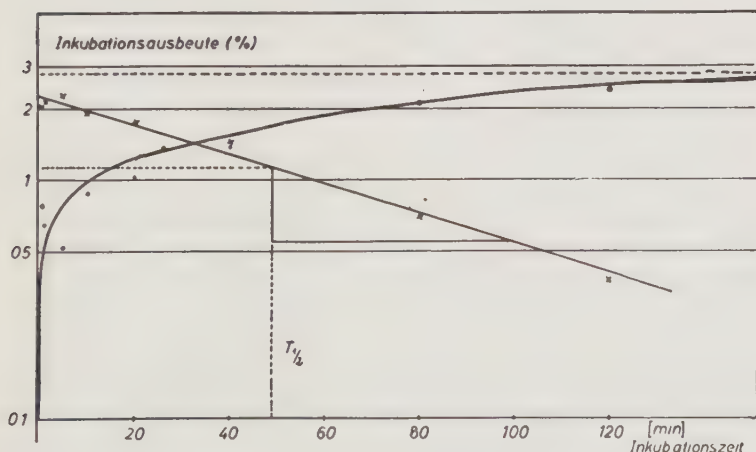


Abb. 1a Inkorporation von K^+ (—) mit Reaktionskurve (---)

Selbst wenn man unmittelbar nach der Inkubation die Werte der Erythrozytenphase mit denen der Überstände vergleichend mißt, liegt die Einbaurate von 15 % nach zwei Stunden noch unter dem Wert, der einer gleichmäßigen Phasenvertei-

lung von ^{42}K bei vorliegendem Hämatokrit von 40 % entspräche. Nach diesem Ergebnis könnte man annehmen, daß Kalium stark verzögert durch den Erythrozyten aufgenommen wird. Beim Auswaschen (Abb.1b) zeigt sich dann allerdings deutlich, daß ein Teil dieses Elementes in der Erythrozytenphase bleibt, denn würde sich ^{42}K gleichmäßig verteilen, müßte bei jedem Waschvorgang in beiden Phasen die gleiche Aktivität zu messen sein (theoretische Kurve). Der Verlauf der Kurve zeigt aber, daß eine bestimmte Menge K^+ im Erythrozyten gebunden wird. Der Einbau ist eine Reaktion erster Ordnung mit einer Halbwertszeit von ~ 48 min. (Abb.1a). Die Elution und deren Reaktionskurve zeigen einen ganz anderen Verlauf. Das beweist, daß beim Einbau von ^{42}K sterische Momente nicht die entscheidende Rolle spielen.

Eine Erklärung dieser Befunde ist im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Man kann nur sagen, daß der Einbau von ^{42}K in den Erythrozyten im Vergleich zu anderen untersuchten Ionen sehr langsam erfolgt und das Bindungsvermögen der roten Blutzelle für überschüssiges Kalium innerhalb von Inkubationszeiten bis zu zwei Stunden recht gering ist.

Der Einbau von Chlor als ^{36}Cl wurde bei einer spezifischen Aktivität von 15 $\mu\text{C/g Cl}$ untersucht. Der Ionendurchmesser von 3,62 Å^(20,33) erhöht sich in wäßriger Lösung durch die einsetzende, nicht stöchiometrisch verlaufende Hydratation nur unmerklich. Trennt man nach einer zweistündigen Inkubation die Überstände von der Erythrozytenphase ab, so liegt der Anteil der Erythrozytenphase bei 28 % der Gesamtaktivität. Das bedeutet, daß bei einem Hämatokrit von 41,5 % der Anteil in der korpuskulären Phase auffallend niedrig ist. Die sehr hohe Elution (Abb.1b), die noch unter der theoretischen Verteilungskurve liegt, zeigt, daß Cl^- nicht in den Erythrozyten gebunden wird. Vielmehr scheint die Tendenz zu bestehen, bevorzugt aus der Zelle auszutreten. Auch in vivo findet sich Chlor vermindert im Erythrozyten (Korpuskel/Serum $\sim 0,72$)⁽⁴¹⁾

Die Einbau- beziehungsweise Elutionsquoten schwanken innerhalb einer Versuchsdauer von zwei Stunden stark. Eine Zeitabhängigkeit ist schlecht erkennbar. Die Einbau- rate nach vorn beschriebener Methode liegt bei 1 % der Gesamtaktivität, ein Beweis, wie schnell das Chlorion die Erythrozytenmembran durchdringen kann und wiederum aus der Zelle eluiert wird.

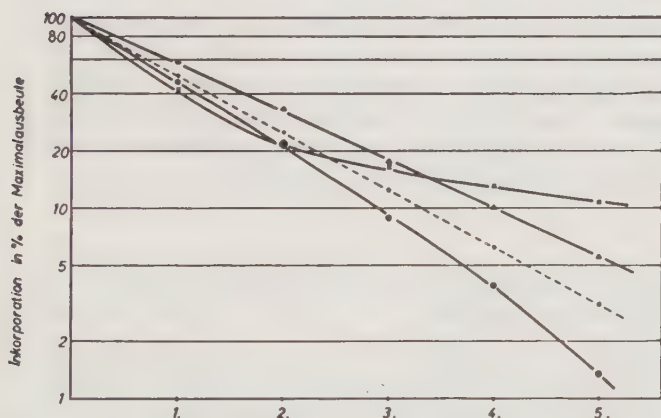


Abb. 1b Zahl des Auswaschens mit 1ml phys NaCl
 K^+ (---○---); Cl^- (—○—); J^- (---○---);
 Theoretische Gerade (.....).

Aus der Reihe der Halogene wurde weiter das $^{131}J^-$ "trägerfrei" untersucht. Auch hier zeigten sich nur graduelle Unterschiede im Vergleich zum Chlor.

Das Jod mit seinem Ionendurchmesser von $4,4 \text{ \AA}^{(20,33)}$ ist in Lösung gleichfalls mit einer Hydrathülle umgeben, die jedoch derart locker gebunden ist, daß sie die effektive Ionengröße nicht wesentlich beeinflussen sollte.

Die Trennung von Überstand und Erythrozyten und die sofortige Messung der Aktivitätsverteilungen ergab einen An-

teil von 36 % der Gesamtaktivität in den Zellen. Einbau und Elution zeigten sich innerhalb einer Versuchsdauer von zwei Stunden als nicht zeitabhängig.

Trägt man die Ergebnisse der einzelnen Waschungen (Abb.1b) in abgebildeter Form auf, ergibt sich fast eine Parallele zu der theoretischen Geraden, wie sie für Ionen gilt, die sich ungehindert auf die beiden Phasen schnell und gleichmäßig verteilen. Dieser Befund und die Beobachtung, daß der vorgelegte Hämatokrit von 38 % dem Anteil von 36 % in der Erythrozytenphase sehr nahe kommt, deutet darauf hin, daß das $^{131}\text{J}^-$ sich gleichmäßig in beiden Medien verteilt. Es erfolgt keine Bindung an den Erythrozyten. So ist es verständlich, daß sich nach der oben beschriebenen Methode stets nur etwa Inkubationsausbeuten zwischen zwei und drei Prozent der Gesamtaktivität zeigten. Auch hier spielte der Zeitfaktor keine Rolle.

A.2) Ionen mit Tetraederform und bekannten Unterschieden in Größe und Ladung

^{32}P als H_2PO_4^- -Molekel ist seit der Einführung in die Markierung von Erythrozyten¹⁴⁾ sehr genau studiert und vielseitig verwendet worden.

Die in Zusammenhang mit dieser Arbeit interessierenden in vitro-Versuche mit Humanerythrozyten gehen zurück auf Untersuchungen von Hevesy und Mitarbeitern¹⁷⁾, Anderson¹⁾ sowie Reeve und Veall³⁷⁾. Alle Autoren geben eine Inkorporation des ^{32}P in menschliche Erythrozyten von etwa 30 % in einer Stunde an. Die in vorliegender Arbeit durchgeführten Inkubationen können mit der heute noch geübten Modifikation der Markierungsmethode nach Reeve und Veall verglichen werden.

Der vergleichsweise mäßige Einbau von 13 % in einer Stunde (Abb.3) kann vorerst nicht erklärt werden. Ob es methodische Fehler sind, oder ob der verlangsamte Einbau in Rindererythrozyten eine Eigenschaft dieser Spezies ist,

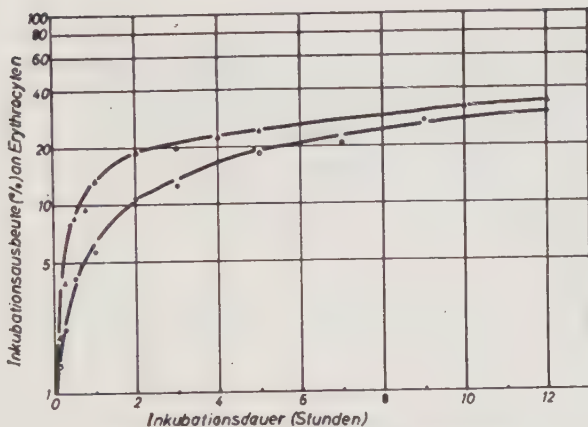


Abb. 3 Inkorporation von H_3PO_4 ohne Trägerzusatz (○) und mit Trägerzusatz 100 mg Natriumphosphat/ml (□)

kann nicht genau gesagt werden. Hahn und Hevesy¹⁵⁾ konnten jedoch zeigen, daß beispielsweise die Einbauraten in Erythrozyten von Pferden sehr viel niedriger liegt als die bei Kaninchen oder menschlichen Erythrozyten. Die Mechanismen des ^{32}P -Einbaus sind sehr oft und vielseitig mit verschiedensten Inhibitoren untersucht worden^{12,15,18)}, ohne eine allgemein anerkannte Klärung zu finden.

Die Elutionsraten von Phosphationen (Abb.4) sind sehr hoch.

Die in der Literatur beschriebenen in vivo-Ergebnisse deuten auf eine rasche Elution hin. Hevesy und Hahn¹⁴⁾ fanden Elutionswerte von 6 % aus anorganischem Phosphat in 26 min. sowie 10 % aus der Phosphatidfraktion in 60 min. In vorliegenden Versuchen fanden sich Werte von etwa 36 % nach vier Stunden. Phosphor scheint fast ausschließlich in das Zellinnere zu gehen, da nur etwa 2 % im Stroma gefunden wurden.

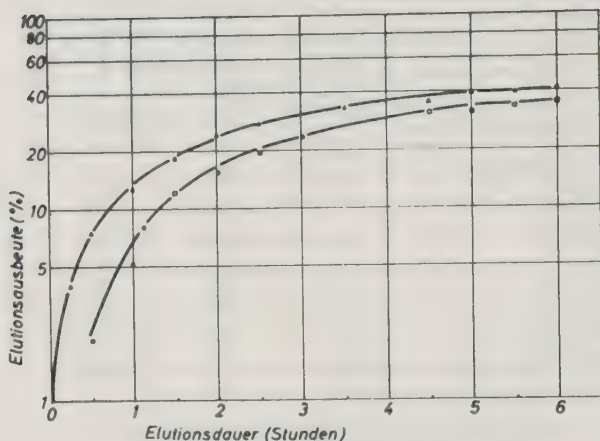


Abb 4 Elution von $H_2PO_4^-$ mit reiner phys. NaCl-Lösung (—○—) und mit Zusatz von 100 g Natriumphosphat/ml (—●—)

Bei den zusätzlich mit 100 g Na_3PO_4 /ml als Trägerzusatz erfolgten Inkorporationen liegen die Inkubationsausbeuten im Durchschnitt etwa 5 % unter den Versuchsreihen ohne Trägerzusatz (Abb.3). Um etwa die gleiche Größe sind die Elutionen niedriger, die man durch Zusatz von 100 g Na_3PO_4 /ml Elutionslösung gewinnt (Abb.4). Grundsätzlich sei vermerkt, daß beim Arbeiten mit $H_2^{32}PO_4^-$ die einzelnen Versuchsreihen, wie bei keinem anderen verwendeten Isotop, starke Schwankungen aufweisen und die Kurve ein Mittel vieler Versuchsreihen darstellt. $H_2^{32}PO_4^-$ als Molekel ist ein Tetraeder in der Größenordnung von $5,0 \text{ \AA}^{(20,33)}$, errechnet aus seinem Molvolumen von 39 ccm.

Auch der zweite untersuchte Tetraeder, in welchem ^{51}Cr als sechswertiges Isotop in einer Verbindung im Gleichgewicht $HCrO_4^- \leftrightarrow CrO_4^{--}$ vorliegt, ist nach der von Gray und Sterling¹³⁾ angegebenen Markierungsmethode sehr ausführlichen experimentellen und klinischen Studien unterzogen worden

und auch heute noch das Mittel der Wahl zur Bestimmung der Lebenszeit roter Blutkörperchen. Die folgenden Angaben sind einer Arbeit von Mundschenk und Fischer³¹⁾ entnommen, da diese Versuche ebenfalls unter gleichen Bedingungen an Erythrozyten in vitro durchgeführt wurden. Obwohl dazu menschliche Erythrozyten verwendet wurden, geht aus Untersuchungen an der gleichen Klinik hervor, daß die Einbauvorgänge bei roten Blutkörperchen von Rindern durchaus vergleichbar sind.

Bei einer spezifischen Aktivität von 115 mC/mg Cr waren nach einer Stunde 95 % der Gesamtaktivität in den Erythrozyten nachzuweisen. Bei der üblichen Stroma-Hämoglobintrennung fanden sich etwa 5 % der Gesamtinkorporation in Bestandteilen der Membran. Wie die Untersuchungen weiter zeigten, liegt die Elution stets unter 2 %. Gleichgültig, ob mit reiner physiologischer Kochsalzlösung oder mit Trägerzusatz von inaktivem Na_2CrO_4 eluiert wurde, blieben die Werte konstant. Das sechswertige Chrom wird nach einem nicht näher bekannten Mechanismus¹³⁾ in der Zelle fixiert. Die Größe des inkorporierten Cr-Komplexes wurde aus dem Molvolumen von 41 ccm für Chrom und der Größe der Liganden ermittelt^{20,33)} und beträgt 5,06 Å.

Das Isotop Selen-75 wurde in zwei Verbindungen geprüft: in vierwertiger Form als Selenit und in sechswertiger Form als Selenat. Beide Verbindungen haben Tetraederform.

Der Selenitkomplex hatte eine spezifische Aktivität von 200 mC/g Se und lag in einem Gleichgewicht von $\text{SeO}_3^{--} \leftrightarrow \text{HSeO}_3^-$ vor. Aus seinem Molvolumen von 35 ccm wurde auf einen effektiven Diameter von 4,80 Å geschlossen^{20,33)}. Der Einbau von Selenit (Abb.5) war insofern interessant, als schon nach etwa zehn Minuten eine Inkorporation von 72 % registriert werden konnte, die danach nur langsam anstieg und nach 24 Stunden etwa 86 % erreichte. Im Stroma wurden Aktivitäten von etwa 3 % gefunden. Selenit scheint im Erythrozyten fixiert zu werden. Die Elutionsanteile (Abb.6) betrugen etwa 7 % nach einer Stunde und waren nahezu konstant in dieser Höhe über eine Versuchsdauer bis zu 12 Stunden.

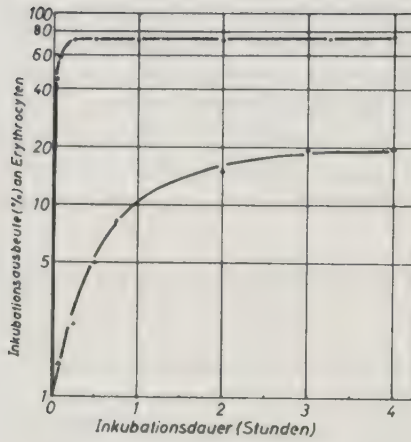


Abb 5 Inkorporation von Selenit (---○) und Selenat (—○—)

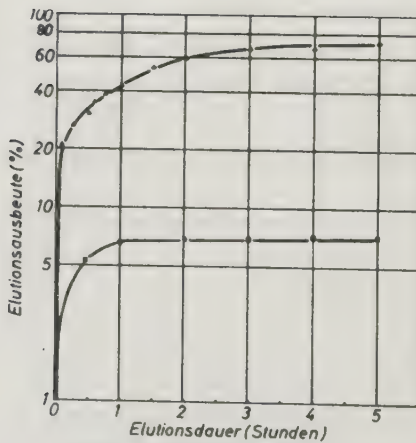


Abb 6 Elution von Selenit (---○) und Selenat (—○—)

Selenat wurde durch Oxydation von Selenit mit Natriumhypochlorit, welches durch Einleiten von Chlor (aus HCl und KMnO_4) in Natronlauge gewonnen wurde, hergestellt. Die Untersuchungen erfolgten mit einem im Gleichgewicht stehenden Ionengemisch von $\text{SeO}_4^{--} \leftrightarrow \text{HSeO}_4^-$. Aus dem Molvolumen von 41 ccm wurde wiederum eine Einzelionengröße von 5,06 Å ermittelt. Selenat hatte eine spezifische Aktivität von 200 mC/g Se. Die Selenatinkorporation wurde vier Stunden beobachtet. Sie stieg kontinuierlich auf etwa 20 % nach dem genannten Zeitraum an (Abb.5). Im Stroma fanden sich nur geringe Anteile der Verbindung. Eine Bindung von Selenat in der roten Blutzelle ist nicht wahrscheinlich. Schon nach einer Stunde findet man nahezu 45 % in der Elutionsphase, nach vier Stunden sind bereits 70 % der inkorporierten Menge wieder aus der Zelle diffundiert. Die doch recht niedrige Selenat-Einbaurate dürfte zum Teil ihre Erklärung darin finden, daß durch den zweimaligen Waschvorgang, der zur Entfernung der Restaktivitäten erforderlich war, die zunächst vorliegende Gleichgewichtsverteilung zugunsten der wäßrigen Phase verschoben wird.

Da es auch ein Anliegen der Arbeit war, Stoffe mit guter Einbauquote und hoher Bindefestigkeit in Erythrozyten zu finden, wurde eine Reihe weiterer Isotope zu Experimenten herangezogen.

Der Einbau von Rhenium-186 erwies sich als wenig erfolgreich. ReO_4^- , als einfach negativ geladenes Ion in Tetraederform vorliegend, stimmt mit Molvolumen und Ionengröße fast völlig mit Selenat überein^{20,33}). Dem Einbau von 15 % nach einer Stunde steht eine Elution von 70 % nach vier Stunden gegenüber, und es gilt sinngemäß das gleiche, was für Selenat und alle sonst leicht zu eluierenden Komplexe gezeigt wurde. Die Stromaanteile an inkorporiertem Rhenium lagen unter einem Prozent des Gesamteinbaus.

A.3) Ionen mit Octaederform, die sich in bekannter Größe und Ladung unterscheiden

Zunächst wurde angenommen, ^{60}Co und seine sämtlichen Verbindungen würden nicht in das Zellinnere des Erythrozyten gelangen, denn nach der Standardmethode fanden sich stets constant und nicht zeitabhängig "Inkubationsausbeuten" von etwa 2 % der Gesamtaktivität.

Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurden analog den Kalium- beziehungsweise Halogenversuchen einzelne Co-Verbindungen in dieser Form untersucht. Beim $(\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6)^{++}$ findet sich nach zwei Stunden bei Auslassen des Waschvorganges ein Anteil von 22 % der Gesamtaktivität in der Erythrozytenphase. Bei vorliegendem Hämatokrit von 40 % ist diese Quote etwas zu niedrig. Auch das Auswaschen zeigt, daß dieser Komplex zunächst sehr schnell aus der Erythrozytenphase entfernt wird (Abb.6a), doch nach mehr als dreimaligem Auswaschen mit je 1 ml physiologischer Kochsalzlösung bleibt ein Anteil von 2 % fest am Erythrozyten gebunden.

Untersucht man $(\text{Co}(\text{NH}_3)_6)^{+++}$ und $\text{Co}((\text{COO})_2)_3$ auf die gleiche Weise, kommt man zu vergleichbaren Ergebnissen.

$\text{Co}((\text{COO})_2)_3$ zeigte nach sofortiger Messung im Anschluß an die Inkubation Einbauquoten von 23,8 % der Gesamtaktivität. Das ist im Vergleich zum vorliegenden Hämatokrit von 38,5 % auch etwas zu niedrig. Beim Auswaschen (Abb.6a) bleibt ein Anteil von 3,8 % fest in der Erythrozytenphase, während alles überschüssige Cobalt sehr rasch aus den Zellen eliminiert wird. Der Cobalt-Amin-Komplex zeigte Einbauquoten von 22,8 % bei vorliegendem Hämatokrit von 33,5 %. Dieser Wert ist ebenfalls zu niedrig, jedoch verbleibt beim Auswaschen ein fest gebundener Cobalt-Anteil von 6,8 % der Gesamtaktivität (Abb.6a). Bei beiden Verbindungen war der Einbau nahezu constant bei Inkubationszeiten von einer Minute bis zu acht Stunden.

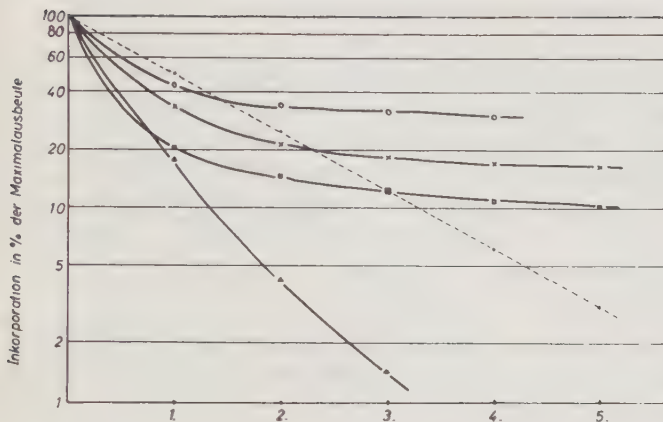


Abb 6a Zahl des Auswaschens mit 1ml phys. NaCl

$[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{+++}$ (—○—); $\text{Co}[(\text{COO})_4]_3$ (—x—);

$[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{++}$ (—●—); $[\text{Co}(\text{CN})_6]^{4-}$ (—▲—);

Theoretische Gerade (---○---)

Beim $(\text{CO}(\text{CN}_2)_6)^{--}$ zeigte sich erstmals eine gewisse Zeitabhängigkeit beim Einbau derart, daß nach einer Minute Inkubation etwa 18 %, nach acht Stunden 27 % der Gesamtaktivität in der Erythrozytenphase vorlagen. Hier ist der Anteil in den Zellen auffallend niedrig im Vergleich zum vorliegenden Hämatokrit von 40 %. Die Reaktionskurve des Einbaus zeigt, daß dieser Prozeß keine Reaktion erster Ordnung ist.

Auffallend im Vergleich zu den anderen Cobaltverbindungen ist die sehr schnelle Elution (Abb.6a). Der Kurvenverlauf zeigt, daß Cobalt-Cyanid nicht vom Erythrozyten gebunden wird, ja daß sogar eine Tendenz besteht, diesen Komplex aus der Erythrozytenphase rasch zu entfernen.

Eine überraschende Beobachtung wurde bei der Untersuchung der Cobalt-Glycin-Verbindung gemacht. Dieser Komplex war schon nach wenigen Minuten mit etwa 90 % am Erythrozyten nachzuweisen. Die anschließende Stroma-Hämoglobin-Trennung zeigte dann, daß die gesamte Aktivität an das Stroma gebunden war. In einem folgenden Versuch wurden Erythrozyten mit geringen Mengen von inaktivem Glycin bis zu 30 Minuten vorbehandelt, zweimal gewaschen und dann eine Markierung mit $(\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6)^{++}$ versucht. Es erfolgte keine vermehrte Bindung dieses Komplexes an die Erythrozyten.

^{60}Co hatte in allen Versuchsreihen eine spezifische Aktivität von 10 C/g Co. Alle Verbindungen sind Octaeder mit einem Durchmesser von etwa $6 \text{ \AA}^{27)$.

Die in der Literatur beschriebenen Versuche mit Radiocobalt sind in vivo durchgeführt. Ihre Ergebnisse sind unterschiedlich. Im menschlichen Blut ist es fast ausschließlich an Serumalbumine gekoppelt^{19a)}. Comar und Davis⁵⁾ zeigten, daß nach einer intravenösen Injektion von Cobalt an Rindern schon 40 Minuten post injektionem sämtliche Spuren des Elementes aus dem Blut verschwunden waren. Amerikanische Untersucher²⁵⁾ fanden bei Experimenten mit Hundeblut auch Werte unter fünf Prozent in Bindung an Erythrozyten.

Das ebenfalls als Octaeder vorliegende $(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{---}$ (spezifische Aktivität 2 C/g Fe) stimmt in seinem Verhalten nahezu vollständig mit dem Cobalt-Amin-Komplex überein. Auch hier ist zunächst der Anteil in der Erythrozytenphase vermindert. Beim Auswaschen bleibt ein Bestand von etwa 6 % der Gesamtaktivität fest an den Erythrozyten.

A.4) Ionen, die in linearer Kettenform vorliegen

Als markierendes Isotop in diesen Verbindungen diente das Silber-110m. Die Inkubationen erfolgten in den Verbindungen von Silbercyanid $(\text{Ag}(\text{CN})_2)^-$ und Silberthiosulfat $(\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3))^{---}$ bei einer spezifischen Aktivität von etwa 200 mC/g Ag. In der Medizin wurde Radiosilber (^{111}Ag) bisher zur Diagnostik verborgener Abszesse, Infektionsherde und Tumoren⁴²⁾ angegeben.

Die vorliegenden Untersuchungen lassen dieses Element in einer neuen Sicht erscheinen. Das einfach negativ geladene Silbercyanid hat etwa eine Kettenlänge von 6 bis 7 Å^{20,33)}, während das Ausmaß in den beiden anderen Dimensionen sehr viel geringer ist. Der Einbau von 58 % nach einer Stunde und von etwa 80 % nach zwei Stunden ist sehr hoch (Abb.7). Wie die Untersuchungen zeigten, ist der Einbau sehr stark abhängig von der spezifischen Aktivität des Silbers sowie der zur Komplexbildung eingesetzten Menge an KCN. Die Schwankungen waren erheblich, und es ist denkbar, daß die Einbaurate bei einer günstigeren spezifischen Aktivität durchaus noch erhöht werden kann. Die Aktivitäten innerhalb des Erythrozyten verteilen sich zu etwa 80 % an intrazelluläre Bestandteile, während 20 % im Stroma zu messen waren.

Silber scheint fest in der Zelle gebunden zu werden, da selbst nach zwanzigstündiger in vitro-Elution nur Spuren unter 1 % im Eluat nachzuweisen waren.

Was für den Cyanid-Komplex typisch war, gilt analog auch für den dreifach negativ geladenen Silberthiosulfat-Komplex, eine schmale Kette von ca. 7 Å Länge^{20,27,33)}. Die Inkorporation dieser Molekel erfolgt schneller (Abb.7) und erreicht schon nach zwei Stunden 85 % der Gesamtaktivität. Der größte Teil der inkorporierten Menge (82 %) war in der Zelle gebunden, 18 % dagegen im Stroma. Die Elutionen lagen auch bei 12-stündiger Elutionsdauer noch unter 2 %, was ganz eindeutig die feste Bindung von $^{110\text{m}}\text{Ag}$ beweist.

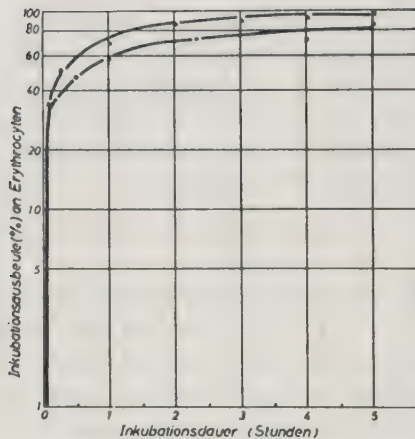


Abb. 7 Inkorporation von Silbercyanid (—○—) und Silberthiosulfat (---○---)

Die hohe Inkubationsausbeute dieser Substanz, die niedrigen Elutionsquoten sowie die gute Nachweisbarkeit des γ -Strahlers bei einer günstigen Halbwertszeit von 253 Tagen lassen dieses Isotop geeignet erscheinen, an in vivo-Versuchen seine Anwendungsmöglichkeit für Lebenszeitbestimmungen roter Blutkörperchen zu prüfen. Damit hätte man die Möglichkeit, solche Bestimmungen über längere Zeiträume durchzuführen, was bei der heute eingeführten ^{51}Cr -Methode nur in einem beschränkten Umfange möglich ist ($T_{1/2} = 27$ Tage).

A.5) Ionen, die als planare Scheiben aufgefaßt werden können (Abb.9) und gleichfalls Unterschiede in Größe und Ladung aufweisen

Die Komplexe, die das vorliegende zweiwertige Kupfer bildet, haben sämtlich die Form von planaren Scheiben^{20,27)}. Wie das Schema der Abbildung 9 zeigt, haben sie eine ebene Fläche von etwa $6 \times 6 \text{ \AA}^{20,27)}$. Die Stärke der Einzelscheibe richtet sich nach dem Durchmesser des größten Ions, das dieser Komplex enthält. Dieser Wert liegt für den Fall des Zentralatoms Kupfer als größtem Atom mit Sicherheit unter $2,8 \text{ \AA}^{20,27)}$. Ist, wie z.B. im Hydrat-, Glycinat- oder Acetylacetonatkomplex, ein Sauerstoffanteil im Verband, vergrößert sich die Scheibendicke etwas, liegt aber bestimmt noch unter $2,8 \text{ \AA}^{20,27)}$.

Am Beispiel des Kupfers konnte schön der Effekt von Ladungen studiert werden, dem bei der negativen Oberflächenladung des Erythrozyten möglicherweise eine entscheidende Bedeutung beizumessen ist. Als Kupferkomplexe wurden zwei Kationen, ein Anion und drei elektrisch neutrale Partikelchen untersucht. Die ebenfalls in gleicher Form und Größe vorliegende Gold-Cyanid-Verbindung war einfach negativ geladen. Die spezifische Aktivität von Cu lag bei 10 bis 50 mC/g Cu; Gold wurde bei 1 bis 3 C/g Au untersucht.

Betrachtet man die einzelnen Molekeln nach ihrer Einbaugeschwindigkeit (Abb.8), so steht das Cu-Acetylacetonat als ungeladenes Teilchen mit einer Inkorporation und zugleich Sättigung von 98 % nach etwa fünf Minuten an der Spitze (Abb.8). Die Elution mit physiologischer Kochsalzlösung war unmerklich und lag nach vier Stunden unter 1 %. Etwa 13 % der Gesamtaktivität waren im Stroma fixiert.

Mit dem Cu-Glycinat folgt ein ebenfalls ungeladener und mit organischen Liganden besetzter Komplex. Der Einbau von 90 % nach einer Stunde (Abb.8) und eine Elutionsausbeute unter 1 % nach vier Stunden sprechen auch dafür, daß dieser Komplex von der Zelle fixiert wird. Im Gegensatz zum

Co-Glycin-Komplex fanden sich hier aber nur etwa 8 % der Gesamtaktivität im Stroma wieder.

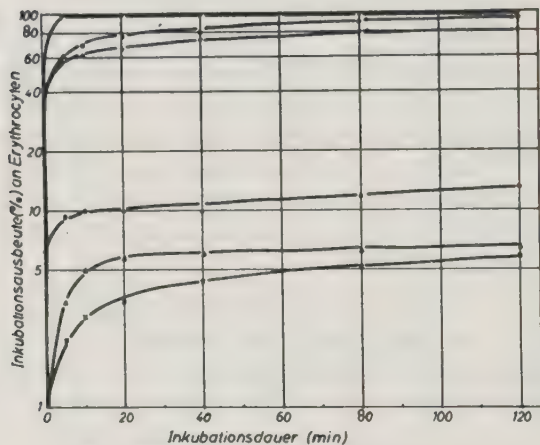


Abb. 8 Inkorporation von Cu-Acetylacetonat (---*), Cu-Glycinat (---*), $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{++}$ (---*), $[\text{Cu}(\text{CN})_4]^{--}$ (---), Cu-Tartrat (---*), $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{++}$ (---*).

Das $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{++}$ liegt als Kation vor. Der Einbau ist bemerkenswert hoch (Abb. 8) und die Bindung relativ ausgeprägt, was Elutionsausbeuten von weniger als 1 % nach vier Stunden durchaus bestätigen. Ein recht hoher Aktivitätsanteil (16 %) war im Stroma zu messen.

Die nun folgenden Cu-Komplexe haben schon wesentlich niedrigere Einbauraten (Abb. 8). $\text{Cu}(\text{CN})_4^{--}$ lag als Anion bei einer Ausbeute von 12 % nach vier Stunden und scheint ein wenig leichter eluierbar zu sein, was aber Werte von unter 2 % nach vier Stunden noch nicht beweisen können.

Mit einem Einbau von nur 5 % nach einer Stunde (Abb.8) überrascht das $(\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4)^{++}$ ein wenig. Obwohl es sterisch fast dem Cu-Amin-Komplex entspricht, stimmt es mit ihm nur in der geringgradigen Elution sowie der Hämoglobin-Stroma-Aktivitätsverteilung (16 % der Erythrozytenaktivität im Stroma) überein. Die Tatsache, daß das gebundene Wasser als Dipol zu einer weiteren Hydratisierung und folglich zu einer Ionenvergrößerung befähigt ist, was bei dem NH_3 -Komplex nicht ausgeschlossen ist, kann als mögliche Deutung diesen Befund erklären.

Schließlich sei noch das elektrisch neutrale Cu-Tartrat genannt, das bei einer Einbauquote von 6 % innerhalb einer Stunde weit unter den Vergleichswerten von Glycinat und Acetylacetonat liegt. Bemerkenswert ist hier der hohe Anteil von etwa 30 % der Gesamtinkorporation im Stroma. Die Bindung scheint fest zu sein, da auch hier nach vier Stunden der Wert im Eluat unter 1 % liegt.

Mit dem Gold-Cyanid-Komplex als Anion (spezifische Aktivität 1 bis 3 C/g Au) wurde die Untersuchung mit Ionen von Scheibenform abgeschlossen. Obwohl negativ geladen, erfolgte sein Einbau sehr schnell (90 % nach einer Stunde i. Abb.1) und war fast ausschließlich an die Bausteine innerhalb der Zelle gebunden. Der Stromaanteil von nur 3,8 % der Gesamtinkorporation ist gering. Die Bindung scheint auch fest zu erfolgen, da Elutionsausbeuten von unter 2 % nach vier Stunden registriert wurden. Betrachtet man rückblickend die Einbauraten dieser Scheibenformen, so findet man bei etwa konstanter Größe sowohl Anionen, als auch Kationen und ungeladene Teilchen an beiden Extremwerten der Einbausekala (Abb.1, Abb.8).

B. Versuche zur Abschätzung der Stärke der Zellmembran bei Rindererythrozyten

Es war nicht die Absicht des Versuches, den ohnehin recht unterschiedlichen Ergebnissen der Literatur einen weiteren Wert hinzuzufügen. Vielmehr wurde einfach die Menge an Substanz, die das Stroma bildet, summarisch bestimmt, ohne auf Teilfraktionen, Quellungszustände und ähnliche, nicht sicher erfaßbare Faktoren zu achten.

Die Rechnung erfolgte nach der Gleichung:

$$d = \frac{G}{O \times g}$$

d: Membranstärke (cm)

G: Gewicht des Stromas (g) von 1 ml Erythrozyten

O: Oberfläche von 1 ml Erythrozyten (cm²)

g: Spezifisches Gewicht des Stromas (g/cm³).

Das Auswaschen des Stromas erfolgte in Parallelversuchen zunächst sechs bis elf mal mit aqua dest., dann fünf mal mit physiologischer Kochsalzlösung und einmal mit aqua dest. beziehungsweise zehn mal mit physiologischer Kochsalzlösung und einmal mit aqua dest. Bei den Waschungen mit physiologischer Kochsalzlösung erfolgte die letzte Waschung mit aqua dest., um die anhaftenden Kochsalzanteile, die nach Trocknung die Wägung stören könnten, zu beseitigen.

Die Versuche zeigten keinen nachweisbaren Gewichtsunterschied des Stromamaterials nach Hämoglobinentfernung mittels aqua dest. beziehungsweise physiologischer Kochsalzlösung. Auffallend war lediglich eine gewisse Quellung der Stromaanteile nach Waschung mit aqua dest.

Im Gegensatz zu Angaben in der Literatur, bei denen nach mehr als fünfmaligen Auswaschungen des Stromas mit Substanzverlusten zu rechnen ist, indem bestimmte Anteile in Lösung gehen, konnte sowohl nach elf Waschungen mit physiologischer Kochsalzlösung als mit aqua dest. kein Gewichtsverlust gegenüber fünfmaligem Auswaschen festgestellt

werden. Die in den einzelnen Versuchsreihen beobachteten Schwankungen waren so unterschiedlich nach beiden Seiten, daß in diesem Punkt schlecht eine genaue Aussage möglich ist.

Die gefundenen Werte für die Membranstärke der Rindererythrozyten lagen zwischen 7 Å und 35 Å. Die Unterschiede sind recht groß, aber auch alle anderen Bestimmungen (s.oben) schwanken zwischen 50 und 5 000 Å. Ganz auffallend aber ist der Befund, daß die ermittelten Werte weit unter allen bisherigen Literaturangaben liegen.

IV. Diskussion der Ergebnisse

A. Zur Permeation anorganischer Ionen durch die Erythrozytenzellmembran

Die Abbildung 10 faßt noch einmal tabellarisch die wichtigsten Daten der untersuchten Komplexe zusammen.

Von den 25 untersuchten Verbindungen lagen 13 als Anionen vor, 7 als Kationen. Fünf der untersuchten Partikeln verhielten sich elektrisch neutral.

Der Ionendurchmesser schwankte zwischen den Werten von $2 \text{ \AA}$ bis $>6 \text{ \AA}$ (Abb.9).

In vorliegenden in vitro-Versuchen wurde grundsätzlich davon ausgegangen, daß sich in einem geschlossenen System für Ionen, die die Erythrozytenmembran penetrieren können, in jedem Falle ein zeitabhängiges, mehr oder weniger stabiles Gleichgewicht der Konzentrationen intra- und extrazellulär einstellen müßte.

Alle Verbindungen wurden in isotonischem Milieu und einem pH um 7,0 untersucht, der mit pH-Papier eingestellt wurde, da der Einbau durch den pH-Wert in mehr oder weniger großem Umfange beeinflusst wird⁴⁰⁾.

Die gezeichneten Kurven sind als Mittelwerte aufzufassen. Je nach der Streubreite wurden für jede Verbindung bis zu sieben Versuchsreihen durchgeführt und entsprechend gemittelt.

Die Technik der Inkorporationsmethode ist sehr einfach und blieb bei allen Untersuchungen gleich, so daß sich wohl von dieser Seite herrührende Fehler nicht im Kurvenverlauf ausdrücken sollten.

Da nur jede Woche einmal frisches Rinderblut zur Verfügung stand und an mehreren Tagen gearbeitet werden mußte, ist auch hier mit Ungenauigkeiten zu rechnen. Davson und Danielli⁷⁾ zeigten, daß schon 24-stündiges Stehen im Serum

zu meßbaren Strukturschwankungen der Erythrozytenmembran und veränderter Ionenpermeabilität führen. Auch einfaches Zentrifugieren veränderte die oben genannten Größen⁷⁾.

Der auf den Erythrozyten beschriebene Plasma-Protein-Film scheint bis auf strukturbildende Eiweißadsorbate durch das beschriebene Waschen der Erythrozyten entfernt zu sein³⁴⁾.

Ein weiterer Unsicherheitsfaktor dieser Versuche ist das Schwanken der spezifischen Aktivität von Isotop zu Isotop. Die Markierung erfolgte immer mit der vom Hersteller gelieferten Substanz (Radiochemical centre Amersham, England). Allein aus diesem Grunde schon können die gezogenen Vergleiche natürlich nicht absolut sein. Die Größe dieses Fehlers ist ohne umfangreiche Versuche nur schwer abzuschätzen, aber sie sollte dennoch Gegenüberstellungen nicht verbieten.

Die Versuchsergebnisse wurden isoliert betrachtet, ohne sie im Zusammenhang mit sicher vorhandenen Umsetzungen von Zellmembran und intrazellulären Bestandteilen näher zu erklären. Es gibt in der Zelle selbst chemische Reaktionen, die den Einbau derart lenken, daß durch Bindung oder Ladungsänderung der diffundierten Teilchen ständig das Gleichgewicht des inkubierten Materials so verändert wird, daß aus einem an sich reinen Diffusionsprozess zwecks Konzentrationsausgleich ein je nach Höhe des Konzentrationspotentials entsprechend hoher Einbau resultiert. Solche Prozesse sind für das Natriumchromat beschrieben^{13,39)}.

Auch der entgegengesetzt gerichtete Mechanismus ist für das Na^+ bekannt, wo als Ausdruck der Lebensfähigkeit der Zelle ganz bestimmte Ionen an der Penetration gehindert werden und bei denen Konzentrationsausgleich Tod bedeutet.

Nach vorliegenden Versuchsergebnissen sollen diese noch einmal unter Berücksichtigung der in der Einleitung formulierten Aufgabenstellung dieser Arbeit (s. S. 4) ausgewertet werden:

a) Abhängigkeit der Permeation durch die Erythrozytenzellmembran von der Größe des Ions:

Der Durchmesser aller untersuchten Partikeln schwankte im Bereich von $2 \text{ \AA}$ bis $6 \text{ \AA}$. Der Versuch, mit diesen verschieden großen Teilchen die Größe der "Poren" zu ermitteln, zeigte einen Teilerfolg. Die Methode einer solchen Bestimmung wäre unter beschriebenen Versuchsbedingungen nahezu vollkommen physiologisch gewesen. Auch die große Zahl der untersuchten Verbindungen hätte die Zuverlässigkeit einer Aussage unterstrichen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen aber mit Sicherheit, daß diese Poren größer als $6 \text{ \AA}$ sein müssen. Für alle 25 untersuchten Verbindungen war die Erythrozytenzellmembran permeabel. Selbst eine Behinderung der $6 \text{ \AA}$ großen Ionen konnte nicht beobachtet werden. Teilchen dieser Größe penetrierten ungehindert und sehr schnell (siehe Octaeder-Komplexe) die Membran.

Wollte man mit dieser Methode die Porengröße erfassen, müßte man die Erythrozyten mit Teilchen größeren Durchmessers inkubieren.

b) Abhängigkeit der Permeation durch die Erythrozytenzellmembran von der Form des Ions:

Von der Vorstellung ausgehend, die Poren der Zellmembran brauchten nicht lochförmiger Art zu sein, sondern könnten ebenso schlitzzartigen Charakter besitzen, wurde bei den Versuchen auch auf die Form der Teilchen geachtet.

Im Bereich bis zu $6 \text{ \AA}$ war die Erythrozytenzellmembran für Kugeln, Tetraeder, Octaeder, linear gestreckte Ketten und planare Scheiben (Abb.9) ungehindert zu penetrieren.

Auch hier waren die Teilchen wohl zu klein, so daß keine Beschränkung der Diffusion eintrat.

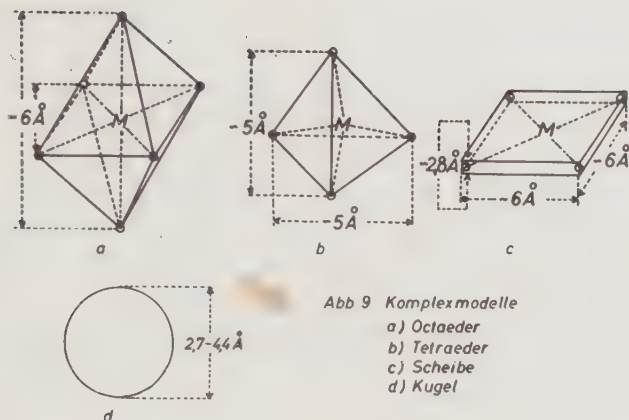


Abb 9 Komplexmodelle

- a) Octaeder
- b) Tetraeder
- c) Scheibe
- d) Kugel

c) Abhängigkeit der Permeation durch die Erythrozytenzellmembran von der L a d u n g des Ions:

Eine Aussage über den Einfluß der Ladungseffekte ist schwer. Sie ist vielleicht erlaubt bei Vergleich der Einbauraten innerhalb einer Gruppe, wo Zentralatom und Größe gleich und nur die Ladungen unterschiedlich sind.

Vergleicht man so die Kupferkomplexe (Abb.8), so stehen ganz eindeutig elektrisch neutrale Verbindungen an der Spitze, gefolgt von einem Kation. Der Abstand zum ersten Anion ($\text{Cu}(\text{CN})_4$)⁻⁻⁻ ist auffallend hoch, aber auch Kationen und elektrisch neutrale Teilchen sind in dieser Gruppe zu finden.

Untersucht man in gleicher Form einmal die Cobaltkomplexe, so stehen allerdings auch hier Kationen und ungeladene Teilchen etwas höher in der Inkubationsausbeute. Auffallend ist die fehlende Bindung des Anions ($\text{Co}(\text{CN})_6$)⁻⁻⁻ (Abb.6a). Es sieht so aus, als würden die Kationen sowie die elektrisch neutralen Partikeln etwas bevorzugt. Ob das allerdings die Penetration direkt betrifft oder ob chemische

Eigenschaften des Zellinneren diesen Effekt bewirken, bleibt dahingestellt.

Bei einem Vergleich der Ionen mit Kugelform ist die rasche Elution der Anionen ebenfalls auffallend.

Neben diesen Befunden steht aber auch der schnelle und hohe Einbau anderer Anionen. Silber- und Goldcyanid (Abb.1; Abb.7) sowie vor allem Silberthiosulfat (Abb.7) ergeben so hohe Einbauquoten, daß das vorher gezeichnete Bild einfach nicht zu halten ist.

Ein Einfluß der Ladung von Ionen dieser Größe auf die Permeation durch die Erythrozytenzellmembran ist nicht signifikant.

d) und e) E i n b a u g e s c h w i n d i g k e i t
 u n d E l u t i o n a n o r g a n i s c h e r I o n e n :

Die Abbildung 10 faßt noch einmal tabellarisch die wesentlichen Daten zusammen. Sie sollen hier nicht noch einmal einzeln ausgeführt werden.

Um zu zeigen, daß es ein Bestreben war, mit vorliegenden Untersuchungen auch durchaus praktische Ziele zu verfolgen, sei auf einige Ergebnisse ganz besonders verwiesen:

Auf der Suche nach weiteren Isotopen beziehungsweise deren Verbindungen zur Markierung von Erythrozyten sind einige Ergebnisse zu verzeichnen:

Das radioaktive Silber-110m mit seinen Verbindungen wird sehr rasch in die rote Blutzelle eingebaut und hat dort eine hohe Binefähigkeit. Es hat, wie das heute gebräuchliche $^{51}\text{Chrom}$, den Vorteil, daß es als γ -Strahler sehr gut und genau nachgewiesen werden kann. Gegenüber dem $^{51}\text{Chrom}$ (Halbwertszeit 27,8 Tage) hat es eine bedeutend längere Halbwertszeit (253 Tage). Diese Eigenschaften lassen es als geeignet erscheinen für Lebenszeitbestimmungen

Ion	Ionenradius	Ladung	Form	Einbau n. 1 Stunde	davon im Strom %	Einbau n. 4 Std. % vom Einbau	Strahl. Isotop u. Strahl.-Art	Halbwerts- zeit
					Einbau > 100%			
Ba^{++}	2,7 Å	pos.	Kugel	14	30	63	^{140}Ba T	12,8 TAGE
Cs^+	3,4 Å	pos.	Kugel	22	-	75	^{137}Cs T	30 JAHRE
K^+	1,33 Å	pos.	Kugel	$\approx 1,8$	-	$\approx$ -	^{42}K T	12,43 STD.
Cl^-	1,81 Å	neg.	Kugel	-	-	$\approx$ -	^{36}Cl T	$303 \cdot 10^3$ JAHRE
J^-	4,4 Å	neg.	Kugel	-	-	$\approx$ -	^{131}J T	8,04 TAGE
$\text{HCrO}_4^- \rightleftharpoons \text{CrO}_4^{--}$	5,06 Å	neg.	Tetraeder	95	5	< 2	^{51}Cr T	27,8 TAGE
H_2PO_4^-	5 Å	neg.	Tetraeder	13	2	36	^{32}P β	14,2 TAGE
ReO_4^-	5,06 Å	neg.	Tetraeder	15	1	70	^{186}Re T	3,7 TAGE
$\text{SeO}_3^{--} \rightleftharpoons \text{HSeO}_3^-$	4,8 Å	neg.	Tetraeder	72	3	7	^{75}Se T	121 TAGE
$\text{SeO}_3^{--} \rightleftharpoons \text{HSeO}_3^-$	5,06 Å	neg.	Tetraeder	10	1	70	^{75}Se T	
$[\text{Co}(\text{CN})_6]^{--}$	> 6 Å	neg.	Octaeder	$\approx$ -	-	$\approx$ -	^{60}Co T	5,27 JAHRE
Co-Glycinal	> 6 Å	-	Octaeder	90	99	~ 3		
$[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{++}$	- 6 Å	pos.	Octaeder	$\approx$ -	-	$\approx$ -		
$[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{++}$	> 6 Å	pos.	Octaeder	$\approx$ -	-	$\approx$ -		
$\text{Co}(\text{COO})_2$	- 6 Å	-	Octaeder	$\approx$ -	-	$\approx$ -		
$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{--}$	- 6 Å	neg.	Octaeder	$\approx$ -	-	$\approx$ -	^{59}Fe T	45 TAGE
$[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$	< 7 Å $\approx$	neg.	Kette	58	20	< 1	^{110}Agm T	253 TAGE
$[\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)]^{--}$	> 7 Å $\approx$	neg.	Kette	75	18	< 2		
Cu-Acetylaceton.	s. Abb. 9c	-	Scheibe	98	13	< 1	^{64}Cu T	128 STD.
$[\text{Cu}(\text{CN})_4]^{--}$	"	neg.	Scheibe	12	5,5	< 2		
Cu-Glycinal	"	-	Scheibe	86	8	< 1		
$[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{++}$	"	pos.	Scheibe	5	16	~ 1		
$[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{++}$	"	pos.	Scheibe	76	16	< 1		
Cu-Tartrat	"	-	Scheibe	6	30	< 1		
$[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$	"	neg.	Scheibe	90	3,8	< 2	^{198}Au T	2,7 TAGE

Abb. 10 ÜBERSICHT der untersuchten Komplexe

$\approx$ die Werte geben die Kettenlänge an

$\approx$ s. Abb. 1a

$\approx$ s. Abb. 1b

$\approx$ s. Abb. 6a

roter Blutkörperchen über eine längere Beobachtungszeit. In seiner Verbindung als Silberthiosulfat wären solche Versuche angezeigt. Vielleicht läßt sich bei anderer spezifischer Aktivität die ohnehin schon sehr gute Einbaurate noch erhöhen (Abb.7).

Praktische Bedeutung kommt unter Umständen noch dem Cu-Glycinat beziehungsweise Cu-Acetylacetonat oder dem Gold-Cyanid zu, die alle gut in den Erythrozyten gelangen und dort fest gebunden werden. Bei ihren kurzen Halbwertszeiten könnten sie für entsprechende hämatologische Untersuchungen durchaus von Bedeutung sein.

Die Inkubationsausbeuten aller anderen Verbindungen sind recht unterschiedlich. Für einige der untersuchten Verbindungen wurden sie nicht angegeben (^{60}Co , ^{36}Cl , ^{131}J), da sie durch die sehr hohen Elutionen ein falsches Bild vortäuschen könnten.

Warum letztlich die verschiedenen Ionen solche Unterschiede im Verhalten zum Erythrozyten aufweisen, ist ungeklärt.

Eine umfassendere Deutung der Permeation anorganischer Ionen durch die Erythrozytenzellmembran ist nach vorliegenden Ergebnissen nicht möglich.

Wenn auch das geschlossene System eines Reagenzglasversuches nicht mit dem "offenen System" des lebenden Organismus verglichen werden soll, so spielen doch sicher auch dort grundsätzlich jene Befunde mit, denen bei in vitro-Versuchen wesentliche Bedeutung zukam, mögen sie auch durch weitere Reaktionen in vielfältigster Form beeinflusst werden und so nicht recht erfaßbar sein.

Bedenkt man, wie schwer und unzureichend selbst die Vorgänge bei in vitro-Versuchen zu deuten sind, so stößt man bei Übertragung dieser Vorgänge in einen lebenden Organismus auf kaum zu überschauende Verhältnisse. Hier lenken zusätzlich komplizierte Systeme die Funktionen der Zellmembranen. Insulin zum Beispiel steigert ganz spezifisch die Permeabilität der Muskelzelle für Zucker²⁴).

Nur physiologische Polysaccharide mit mehr als vier Kohlenstoffatomen gelangen in vivo in den Erythrozyten¹⁶⁾. Die Reihe der Beispiele ließe sich fortsetzen.

B. Zu dem Modellversuch über die vorliegende Stärke der Zellmembran bei Rinder-Erythrozyten

Die ausgeführten Bestimmungen wurden durch eine Reihe von Unsicherheitsfaktoren belastet:

Als spezifisches Gewicht des Stromas wurde einfach das des gesamten Rindererythrozyten gewählt, da weitere Angaben in der Literatur fehlen. Der Fehler, der nach Rechnung mit dem Faktor 1,084 auftreten könnte, dürfte allerdings nicht sehr erheblich sein. Viel mehr fällt dagegen ins Gewicht, daß die Membran ganz isoliert betrachtet wurde, ohne auf ihre Veränderungen unter physiologischen Bedingungen Rücksicht zu nehmen. Die hier auftretenden Schwankungen durch Quellungszustände und vieles andere sind schwer überschaubar. Der Fehler ist sicher sehr erheblich, wenngleich Waugh und Schmitt⁴⁰⁾ auch angeben, daß das Stroma während der Lufttrocknung nicht mehr als 25 % seiner Stärke verliert. Würde man dieses in Betracht ziehen, lägen die bisherigen Angaben der Literatur aber immer noch weit höher.

Nicht zu übersehen sind bei vorgenommenem Versuch auch die technischen Schwierigkeiten:

Eine Menge von etwa 25 mg (durchschnittliches Stromagewicht von 30 ml Vollblut) aus einem Zentrifugenröhrchen in ein Wägeschälchen verlustlos zu überführen, ist gewiß auch mit Substanzverlusten verbunden, so daß die gefundenen Werte entsprechend zu niedrig liegen. Hinzu kommt noch, daß die Schwankungen bei Wägung von 25 mg in Schälchen mit einem Leergewicht von etwa 2,0 bis 2,5 g ganz erheblich sind.

Fraglich ist außerdem, ob die Zentrifugation ausreichend war für die vollständige Sedimentierung aller das Stroma bildenden Substanzen.

Die vorliegenden Ergebnisse sind natürlich nur mit oben erwähnter Kritik zu sehen und sind deshalb schlecht mit den allerdings auch nicht fehlerfreien Werten weit komplizierterer Untersuchungsmethoden vergleichbar. Die wahre Stärke der Membran liegt ohne Zweifel höher, aber daß Größenordnungen von über 1 000 Å allein durch bisher nicht näher bekannte Vorgänge aus vorliegendem Stromamaterial resultieren sollten, muß nach diesen Ergebnissen doch zweifelhaft erscheinen.

Grundidee dieser Untersuchung war es, einmal zu versuchen, mit einer sehr einfachen Methode Membranstärken von Erythrozyten abzuschätzen.

V. Zusammenfassung

In vorliegender Arbeit wurde die Permeation anorganischer Ionen durch die Erythrozytenzellmembran von Rindern mittels radioaktiver Isotope in vitro untersucht. Die Versuche erfolgten mit Anionen, Kationen und elektrisch neutralen Verbindungen.

Der Ionendurchmesser schwankte zwischen 2 Å und 6 Å. Die Form der Partikeln war unterschiedlich (Kugeln, Octaeder, Tetraeder, linear gestreckte Ketten und planare Scheiben).

Die Inkorporationen und Elutionen wurden in Abhängigkeit von der Zeit studiert und graphisch dargestellt. Diese Ergebnisse sind tabellarisch erfaßt (Abb.10).

Nach der Markierung wurde eine Aktivitätsverteilung für Stroma und Hämoglobin vorgenommen.

Die Permeation anorganischer Ionen bis zu 6 Å Durchmesser zeigte keine sterische Behinderung.

Die Form dieser Teilchen hatte keinen Einfluß auf die Penetration in die rote Blutzelle. Auch Ladungseffekte waren nicht entscheidend für die Permeation, da Kationen, Anionen und elektrisch neutrale Verbindungen das Zellinnere erreichten.

Auf der Suche nach neuen Radioisotopen, die für eine Erythrozytenmarkierung geeignet sind, wurde mit dem Silber-110m in seiner Verbindung $(\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3))^{---}$ ein weiteres Isotop gefunden, das für Lebenszeitbestimmungen roter Blutkörperchen von Bedeutung sein könnte.

Es wurde ein Versuch unternommen, mit einer sehr einfachen Methode die Stärke der Erythrozytenmembran abzuschätzen.

- 1a) Abramson, H.A., J.Gen.Physiol. 12 (1929), 711. Entnommen aus Literaturangabe Nr.4
- 1) Anderson, R.S.: Use of radioactive phosphorus for determining circulating erythrocyte volumes. Amer.J.Phys. 137 (1942), 539
- 2) Bernhard, W.: Electron microscope studies on thin sections of human erythrocytes. Nature (London) 170 (1952), 359
- 3) Bessis, M., M.Bricka: Etude au microscope électronique sur l'hémolyse, l'agglutination, la forme et la structure des globules rouges. Rev.Haemat. 5 (1950), 396
- 4) Blood and other Body Fluids - Analysis and compitation by P.L.Altman, Edited by D.S.Dittmer, Washington 1961
- 5) Comar, C.L., G.K.Davis: Cobalt metabolism studies: Exkretion and tissue distribution of radioactive cobalt administered to cattle. Arch.Biochem. 12 (1947), 257
- 6) Danielli, J.F., H.Davson: A contribution to the theory of permeability of thin films. J.cell.comp. Physiol. 5 (1935), 495
- 7) Davson, H., J.F.Danielli: Studies on permeability of erythrocytes; factors in cation permeability. Biochem.J. 32 (1938), 991
- 8) Dervichian, D.G., G.Fournet, A.Guinier: Mise en évidence d'une structure submicroscopique dans les globules rouges par la diffusion des rayons x aux petits angles. Compt.Rend.Acad.d.sc. 224 (1947), 1848
- 9) Erickson, B.N., H.J.Saunders, H.C.Shepherd, D.M.Teague, H.H.Williams: Relation between cerebroside and neutral fat contents of blood plasma, erythrocytes and stroma. Proc.Soc.exp.Biol.Med. 45 (1940), 153
- 10) Erickson, B.N., Williams, H.H., F.C.Hummel, I.G.Macey: Lipid and mineral distribution in serum and erythrocytes of normal children. J.biol.Chem. 118 (1937), 15
- 11) Fricke, H.: The electric impedance of suspensions of biological cells. Cold.Spr.Harb.Symp.quant.Biol. 1 (1933), 117
- 12) Gourley, D.R.H.: Inhibition of uptake of radioactive phosphate by human erythrocytes in vitro. Am.J. Physiol. 164 (1951) 213

- 13) Gray, S.J., K.Sterling: The tagging of red cells and plasma proteins with radioactive chromium. J.clin. Invest. 29 (1950), 1604
- 14) Hahn, L., G.Hevesy: A method of blood volume determination. Acta phys.scand. 1 (1940), 3
- 15) Hahn, L., G.Hevesy: Rate of penetration of ions into erythrocytes. Acta phys.scand. 3 (1942), 193
- 16) Heinz, E.: Stofftransporte im menschlichen Körper. Dtsch.med.Wschr. 37 (1962) 1829
- 17) Hevesy, G., K.Zehran: Determination of the red corpuscule content. Acta phys.scand. 4 (1942), 376
- 18) Hevesy, G.: Radioactive Indicators. Their application in biochemistry, animal physiology and pathology. Interscience Publisher Ltd London 1948
- 19) Hillier, J., J.F.Hoffman: On ultrastructure of plasma membrane as determined by electron microscope. J.cell.comp.Phys. 42 (1953), 203
- 19a Horst, W. und H.H.Schumacher: Papierelektrophoretische Untersuchungen von Schilddrüsenextrakten und Seren nach in vitro-Zusatz von Radiojod, Radiomangan und Radiokobalt sowie in vivo-Gabe von Radiojodid. Klin. Wschr. 20 (1954), 361
- 19b Howe, C.: Influenza virus receptor and blood group antigens of human erythrocyte stroma. J.Immunol. 66 (1951), 9
- 20) Hückel, W.: Anorganische Strukturchemie. Ferdinand-Enke-Verlag Stuttgart 1948
- 21) Jung, F.: Strukturprobleme am roten Blutkörperchen. Naturwiss. 37 (1950), 229
- 22) Koefoed-Johnsen, V., H.H.Ussing: The contributions of diffusion and flow to the passage of D₂O through living membranes; effect of neurohypophyseal hormone on isolated anuran skin. Acta physiol.scand. 28 (1953), 60
- 23) Latta, H.: Surface of mammalian erythrocyte; electron microscope study of effect of lipid solvents, fixatives, hypotonicity and hemolysin (amboceptor) and complement. Blood 7 (1952), 508
- 24) Levine, R., M.S.Goldstein: On the mechanism of the action of insulin. Recent Progr.Hormone Res.11 (1955), 343
- 25) Lee, Ch.Ch., L.F.Wolterink: Blood and tissue of cobalt-60 in dogs. Amer.J.Physiol. 183 (1955), 173

- 25a Löhrr, G.W., H.C.Waller, O.Karges, B.Schlegel und A.A. Müller: Zur Biochemie der Alterung menschlicher Erythrozyten. Klin.Wschr. 36 (1958), 1008
- 26) Mac Leod, J.: Red-cell density in certain common animals. Quart.J.Exp.Physiol. (London) 22 (1932), 275
- 27) Martell, A.E., M.Calvin: Die Chemie der Chelatverbindungen. Verlag Chemie GmbH Weinheim/Bergstr. 1958
- 28) Mitchison, J.M.: Thickness and structure of membrane of human red cell ghost. Nature (London) 166 (1950), 347
- 28a Moskowitz, M. and M.Calvin, Exp.cell.Res. 3 (1952), 33 (entnommen aus Literaturangabe Nr.36)
- 29) Mudd, S., E.B.H.Mudd: Surface composition of normal and sensitized mammalian blood cells. J.exp.Med. 43 (1926), 127
- 30) Mullins, J., W.O.Fenn, T.R.Noonan, L.Haegel: Rate of penetration of labeled potassium. Amer.J.Physiol. 135 (1941), 93
- 31) Mundschenk, H., J.Fischer: Zur Reaktionskinetik der Markierung normaler menschlicher Erythrozyten mit $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ und $^{51}\text{CrCl}_3$. Pflügers Archiv. 275 (1962), 46
- 32) Parpart, A.K.: The preparation of red cell membranes. J.cell.comp.Physiol. 19 (1942), 248
- 33) Pauling, L.: The nature of the chemical bond. Cornell university press Ithaca-New York 1960
- 34) Piper, W., G.Ruhenstroth-Bauer: Untersuchungen über die Proteinadsorption an menschlichen Erythrozyten. Klin.Wschr. 34 (1956), 11
- 35) Ponder, E.: Haemolysis and related phenomena. New York Grune and Stratton (1948), S.367
- 36) Prankerd, T.A.J.: The red cell. An account of its chemical physiology and pathology. Oxford Blackwell (1961)
- 37) Reeve, E.B., N.A.Veall: Simplified method for determination of circulating red-cell volume with radioactive phosphorus. J.Phys. 108 (1949), 12
- 37a Ruhenstroth-Bauer, G.: Die Struktur des Säugererythrozyten. Handbuch der ges. Hämatologie, Bd 1, S.210, Urban und Schwarzenberg, München-Berlin 1959

- 38). Schmitt, F.O., R.S.Bear, E.Ponder: The red cell envelope considered as a wiener mixed body. J.of cell.comp.Physiol. 11 (1938), 309
- 39) Schmitt, H., H.A.E.Schmidt, M.Matthes, W.Keiderling: Die Radiochrommarkierung als Mittel zur Wertigkeitsbestimmung von Blutkonserven. Die Bindung des Radiochroms in frischen und gelagerten Erythrozyten. Acta haemat. (Basel) 23 (1960), 150
- 39a Wagner, H.N., M.A.Razzack, R.A.Gaertner, W.P.Caine and O.Th.Feagin: Removal of erythrocytes from the circulation. Arch.int.Med. 110 (1962), 90
- 40) Waugh, D.F., F.O.Schmitt: Investigation of the thickness and ultrastructure of cellular membranes by the analytical leptoscope. Cold.Spr.Harb.Symp. quant.Biol. 8 (1940), 233
- 41) Weir, E.G., A.B.Hastings: Distrubution of bromide and chloride in tissues and body fluids. J.Biol. Chem. 129 (1939), 547
- 42) West, H.D., A.P.Johnson, C.W.Johnson: The use of radioactive silver for the detection of abscesses and tumors. The concentration of ^{111}Ag in spontaneous and experimentally induced abscesses. J.Lab.clin. Med. 34 (1949), 1376
- 43) Williams, H.H., B.N.Erickson, I.G.Macey: Chemical structure of red blood cell. Quart.Rev.Biol. 16 (1941), 80
- 44) Winkler, K.C., H.G.Bungenberg de Jong: Structure of the erythrocyte membrane. Arch.neerld.Physiol. 25 (1940), 430
- 45) Wolpers, C.: Zur Feinstruktur der Erythrozytenmembran. Naturwiss. 29 (1941), 416
- 46) Wolpers, C., K.Zwickau: Zur Frage der Erythrozytenmembran. Fol.haemat. 66 (1942), 211.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. R. Duesberg
für die Überlassung des Themas sowie für die
Förderung, die er der Arbeit hat zu Teil wer-
den lassen.

Den Herren Dr. J. Fischer und Dr. H. Mundschenk
danke ich für die stets hilfsbereite Beratung
in vielen Fragen der Arbeit.

L e b e n s l a u f

Am 1. Februar 1939 wurde ich, Roland Wanitschke, als Sohn des kaufmännischen Angestellten Rudolf Wanitschke und dessen Ehefrau Klara, geb. Briesel, als zweites Kind von drei Geschwistern in Katscher, Kreis Grulich im Sudetenland, geboren.

Nach der Aussiedlung im Jahre 1946 kam ich in die mecklenburgische Kreisstadt Gadebusch, wo ich noch im gleichen Jahr in die dortige achtsstufige Volksschule eintrat, die ich im Jahre 1953 mit der Abschlußprüfung beendete. Anschließend besuchte ich am gleichen Ort die Oberschule und legte im Jahre 1957 die Reifeprüfung erfolgreich ab.

Im Wintersemester des gleichen Jahres wurde ich an der Humboldt-Universität in Berlin immatrikuliert und studierte dort zwei Semester Humanmedizin, die ich mit dem bestandenen Vorphysikum abschloß.

Aus familiären Gründen wechselte ich im Sommer 1958 meinen Wohnsitz nach Ulm/Donau. Für die Berechtigung zum Hochschulstudium in der Bundesrepublik Deutschland mußte ich eine Ergänzungsprüfung zu meinem Abitur ablegen, die ich im Frühjahr 1959 nach halbjähriger Vorbereitung an einem Gymnasium in Erlangen bestand. Sogleich setzte ich im Sommersemester 1959 an der Universität in Mainz mein Medizinstudium fort und bestand hier im Herbst 1960 das Physikum. Auch während meines klinischen Studiums blieb ich in Mainz. Im Wintersemester 1961/62 begann ich mit meiner Doktorarbeit an der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Johannes Gutenberg-Universität.

Nach dem Sommersemester 1963 möchte ich nach 11-semestrigem Medizinstudium das medizinische Staatsexamen in Mainz ablegen.

